



新規胎児性肺腺癌マーカーの網羅的探索及び、 drebrinの臨床病理学的特徴

著者	猪山 慎治
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8247号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00147908

氏 名	猪山 慎治
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 8247 号
学位授与年月	平成 29 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	新規胎児性肺腺癌マーカーの網羅的探索及び、drebrin の臨床病理学的特徴
主 査	筑波大学教授 博士（医学） 関根 郁夫
副 査	筑波大学教授 博士（医学） 小田 竜也
副 査	筑波大学教授 医学博士 島居 徹
副 査	筑波大学助教 博士（理学） 山下 年晴

論文の内容の要旨

猪山慎治氏の博士学位論文は、肺腺癌に特徴的に反応する新たな胎児性癌マーカーを開発し、肺腺癌における発現と臨床病理学的特徴との関連を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

肺腺癌は、診断時にすでに進行癌となっている症例が多い予後不良な癌種である。本研究は、1. ブタ胎児を免疫原として用いてマウス単クローン抗体を作製し、ヒト肺腺癌に特徴的に反応する新たな胎児性癌マーカーを網羅的に探索すること、2. 得られた胎児性癌マーカーの肺腺癌における発現を解析し、その臨床病理学的特徴を検討することを目的として行ったものである。

（方法）

著者は、BALB/c マウスを抗原蛋白で免疫し、得られたリンパ球を回収、マウスミエローマ細胞 SP2/0 と細胞融合し、ハイブリドーマを作製している。抗原蛋白は、初回免疫用としてミニブタ胎仔肺核分画が、追加免疫用として①ミニブタ胎仔肺核分画、②ヒト肺腺癌核分画、ヒストン抗体③ H3K27ac と④H3K27me3 を使用したヒト肺癌クロマチン免疫沈降サンプルが使用されている。それぞれ得られたハイブリドーマ上清を用いてスクリーニングが行われている。一次スクリーニングとしてマウス IgG ELISA を利用し、IgG 産生クローンが選別された。二次スクリーニングでは、ヒト肺癌 22 症例とそれに対応する正常肺、ミニブタ胎仔肺・成体肺を搭載した組織マイクロアレイを用い、免疫組織化学染色を行い肺腺癌に特徴的に反応するクローンが選別された。さらに著者は、得られたクローンの抗原同定を行い、その抗体を使用して、1999 年から 2007 年の間に筑波大学附属病院にて摘出された肺腺癌 200 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本について免疫組織化学による発現解析を行った。発現解析の結果と臨床病理学的因子との関連が調べられた。

(結果)

著者は合計 1767 クローンハイブリドーマを作製した。そのうち ELISA を用いる 1 次スクリーニングにて IgG 産生を認めたのは 1227 クローンであった。更に増殖性の高い 1131 クローンをを用いて、組織マイクロアレイによる免疫組織化学スクリーニングが行われた。ブタ成体肺、ヒト正常肺と比較してブタ胎仔肺・肺腺癌で染色性に差があったクローンは、25 クローンであった。その中で肺腺癌に明瞭に染色され、正常気管支や肺胞と比較して差があったのは 7 クローンあり、染色局在は、肺腺癌細胞質全体に染色される 2 クローン、肺腺癌細胞質内に顆粒状に染色される 1 クローン、肺腺癌細胞質および細胞膜に染色される 4 クローンに分類できた。これらの 4 クローンでは肺腺癌細胞株とブタ胎仔肺細胞のウェスタンブロット解析で 120 k Da 付近にバンドが確認された。著者は、この中で免疫組織化学染色的に最も差異のはっきりしたクローン B246 に注目した。この B246 の産生する単クローン抗体が精製され、PC-9 の抽出蛋白を用いて免疫沈降が行われた。さらに質量分析とプロテインアレイ解析が行われ、最終的にこの抗体の認識する抗原タンパクは drebrin (DBN1) であることが確定した。他の 3 クローンも drebrin 認識抗体を産生していた。

次に著者は肺腺癌 200 症例で drebrin 発現解析を行った。drebrin 発現は、156 例 (78%) で陽性となり、上皮内腺癌 (10/27 例 37%)、微少浸潤性腺癌 (9/15 例 60%) と比較して、浸潤性腺癌で drebrin 陽性率は高くなった (137/158 例 88%)。従って、本研究で drebrin は進行した症例においてより発現が高くなることが明らかになった。さらに著者は、強発現群と弱発現群の 2 群に分けて両群の無病生存率を比較し、drebrin 強発現群では弱発現群と比較して有意に予後不良であることを示した ($p=0.033$)。全生存期間のカプランマイヤー曲線では、drebrin 弱発現群と比較して drebrin 強発現群は予後が悪い傾向にあった (p 値=0.061)。さらに著者は、2 cm 以下の小型肺腺癌野口分類 type A-C 80 症例に関して解析を行った。drebrin の発現は、性別、脈管侵襲、リンパ管侵襲、野口分類 (浸潤の程度の分類である) において統計学的有意差を認めた。無病生存期間及び全生存期間は、drebrin 弱発現群と比較して drebrin 強発現群では統計学的有意に予後が悪かった。

(考察)

上記実験について著者の考察は以下のようである。

1. 予備実験ではブタ胎仔肺の全蛋白やヒト肺腺癌の凍結組織全蛋白で初回・追加免疫したが、得られたハイブリドーマの数が少なく、免疫組織化学を利用したスクリーニングで有意なものは得られなかった。そこでケラチン・アクチンなどの非特異的な蛋白を除去して免疫するために核分画を免疫原として使用した。今回の実験がうまく行った理由の 1 つと考えられた。
2. drebrin は 985 年白尾らによりニワトリ脳から発見された蛋白である。成熟型 (A) と幼弱型 (E) の 2 つのアイソフォームがあるが、本研究において作成した B246 抗体は、おそらく drebrin A と E の共通部位を認識しているものと思われる。今後は、作製した抗 drebrin 単クローン抗体のエピトープ解析が必要である。
3. drebrin は、神経膠腫、大腸癌、膀胱癌においてがん細胞の移動や浸潤に関与していることが報告されている。また、非小細胞肺癌においては術後再発と関わるという報告がある。本研究結果から、drebrin は非小細胞肺癌においても増殖と浸潤に関与していると考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、肺腺癌に反応する胎児性癌マーカーを網羅的に探索した初めての研究であり、その独創性は他に類を見ない。予備実験ではうまく行かなかったが、免疫原を精製することによって肺腺癌細胞に発現する蛋白質 (drebrin) に特異的に反応する抗体を作り出すことに成功した。著者の研究者としての高い科学的思考と諦めずに実験を遂行した粘り強さは特記するに値する。

平成 29 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。